

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

S1 1 AN="JP 7820487"
?t 1/9

1/9/1
DIALOG(R)File 345:Inpadoc/Fam.& Legal Stat
(c) 2001 EPO. All rts. reserv.

2839582
Basic Patent (No,Kind,Date): JP 54113784 A2 790905 <No. of Patents: 001>

PATENT FAMILY:

JAPAN (JP)

Patent (No,Kind,Date): JP 54113784 A2 790905
TEMPERATURE CONTROLLER (English)
Patent Assignee: TOKYO SHIBAURA ELECTRIC CO
Author (Inventor): NAGAO KOUICHI; OGITA YASUHIRO
Priority (No,Kind,Date): JP 7820487 A 780224
Applic (No,Kind,Date): JP 7820487 A 780224
IPC: * G05D-023/20; F25D-011/00
JAPIO Reference No: * 030137M000116
Language of Document: Japanese

公開特許公報

昭53—20487

⑤Int. Cl. ²	識別記号	⑥日本分類	庁内整理番号	④公開 昭和53年(1978)2月24日
C 07 G 7/02	1 0 2	36(2) C 2	7235—49	
C 07 G 7/028		113 E 6	6904—49	発明の数 1
C 12 D 13/10	1 0 2	113 A 22	6807—49	審査請求 未請求
G 01 N 31/14				
G 01 N 31/22	1 0 4			
G 01 N 33/16				

(全 7 頁)

⑧微生物リポプロテインリパーゼの精製方法

名古屋市西区本郷町4丁目4番地

②特 願 昭51—94957

①出 願 人 天野製薬株式会社

③出 願 昭51(1976)8月11日

名古屋市中区錦1丁目1番2号

④発 明 者 犬飼忠彦

⑦代 理 人 弁理士 戸田親男

明 細 書

1. 発明の名称

微生物リポプロテインリパーゼの精製方法

2. 特許請求の範囲

1. 微生物リポプロテインリパーゼ含有液を高濃度の有機溶媒で処理し、除沈後、得られる該微生物リポプロテインリパーゼ含有高濃度有機溶媒溶液に更に有機溶媒または塩類を加えて高純度の微生物リポプロテインリパーゼを得ることを特徴とする微生物リポプロテインリパーゼの精製方法。

2. 特許請求の範囲第1項の方法で得られた高純度微生物リポプロテインリパーゼの水溶液を脱塩処理後、親水性有機溶媒存在下で微生物リポプロテインリパーゼ結晶を生成せしめることを特徴とする微生物リポプロテインリパーゼの精製方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は微生物リポプロテインリパーゼ(以下微生物LPLと略す)の高純度精製方法に関するものである。

更に詳細には本発明は微生物LPLを結晶化する

精製方法に関するものである。

一般にLPLは生体液中におけるカイロマイクロン等のリポプロテインのグリセライドを加水分解する酵素として古くから知られていたが、これが生体内現象としてとらえられているに過ぎなかつた。しかしながら、シュードモナス属、ムコール属、ストレプトミセス属、セラチア属、エフロモナス属、バチルス属等の微生物によつて、生体内リポプロテインリパーゼと類似した作用を有するリパーゼが生産され(特公昭41-7836号公報)微生物LPLと称している。

微生物LPLは大量生産が可能であることより、その利用研究が盛んで、特に近年、いわゆる診断用試薬関係の開発が活発となり、微生物LPLが血清中蛋白により阻害されないのみか、活性化を受ける特性を利用して血中トリグリセライド定量用試薬として微生物LPLを用いる方法が開発されてきたのである。

しかし血中トリグリセライド定量用試薬として使用される酵素には高純度が要求されるが、微生

物 LPL の精製は困難であり、特にその結晶化に至るまでとされていた。

そこで本発明者は、微生物 LPL をより高純度化し結晶化をすることができれば産業上きわめて有益であるとの考えのもとに、微生物 LPL の効率的な精製方法を鋭意研究してきたところ、簡便にして且つ高収率に従来至難とされていた微生物 LPL の結晶化に成功したのである。

本発明は微生物 LPL 含有液を高濃度の有機溶媒にて処理し沈降後得られた微生物 LPL 含有高濃度有機溶媒溶液に更に有機溶媒または塩類を加えて高純度の微生物 LPL を得ることを特徴とする微生物 LPL の精製方法及びかくして得られる高純度微生物 LPL 含有液を脱塩処理した後、有機溶媒中に結晶化沈降を生成せしめる微生物 LPL の精製方法である。

本発明においては微生物 LPL 生産菌の培養物より得られるあらゆる形態の微生物 LPL 含有液に高濃度有機溶媒を加え生じた沈降物を除去したものを LPL 含有高濃度有機溶媒溶液とする。有機溶

(3)

て有機溶媒濃度を高めることにより微生物 LPL を沈降させる方法及び微生物 LPL 含有高濃度有機溶媒溶液に直接塩類を加えて、有機溶媒存在下に塩析する方法を提供するものである。微生物 LPL 含有高濃度有機溶媒溶液の溶媒を除去後塩析により微生物 LPL を取得する方法よりもその経済性及び得られる酵素の純度の点で遙かにすぐれている。

微生物 LPL 含有高濃度有機溶媒溶液に添加される塩としては、酢酸ソーダ、硫酸、酢酸カリ、硫酸リチウムなどが挙げられる。

塩の添加量は、有機溶媒の種類、濃度により変化するが微生物 LPL 含有高濃度有機溶媒溶液量の 10 ~ 30 重量%程度でよい。

微生物 LPL 含有液の有機溶媒高濃度処理についての微生物 LPL 含有高濃度有機溶媒溶液から有機溶媒濃度を更に高める方法または塩類を加える方法によつて微生物の LPL はそのほとんどすべてが沈降として得られ、この操作により LPL 活性を極めて効率良く取得でき、また色素類、澱粉、油脂等を除去でき本酵素の比活性も 200 倍以上に一挙に

(5)

特開昭53-20487(2)

媒としてはアセトン、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、3級ブタノール等のいずれか一種もしくはこれらの混合物が使用される。添加する有機溶媒の量は、酵素濃度、塩析の際に用いられる塩の種類、有機溶媒の種類によつても最適量は変化するが、微生物 LPL 含有液量に対して 1.0 ~ 3.0 倍量が適当である。

一般に蛋白質類、糖類等は 1.5 ~ 3.0 倍量以上の有機溶媒の添加により、不溶化することが知られており、この性質を利用して、含有液より、目的とする物質を回収することが常である。しかしながら微生物 LPL は、これ等の有機溶媒濃度では全く沈降せず、沈降するに要する有機溶媒濃度は更に高濃度であることが判明したので本発明者は、この性質を利用し LPL 含有液中に含まれる夾雑蛋白、糖類を除去する手段として高濃度有機溶媒処理を提供するものでこの工程により比活性を一気に上げることが出来たのである。

次いで微生物 LPL 含有高濃度有機溶媒溶液より、微生物 LPL の取得方法として更に有機溶媒を加え

(4)

上昇する。

この様にして得られた高純度微生物 LPL を少量の水に溶解し常法により脱塩し、そのまま、もしくは本酵素の失活をまねかない方法で濃縮して有機溶媒を添加し、結晶化を行なう。添加する有機溶媒はアセトン、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、3級ブタノール等好ましくはアセトン、プロパノール、イソプロパノール、3級ブタノールでその添加量は酵素溶液量に対して 1.0 ~ 2.0 倍量である。有機溶媒を添加した酵素液はそのまま室温か、好ましくは冷蔵庫中に放置して結晶を生成せしめる。

結晶化の条件としては、酵素液中の酵素濃度が低い場合には添加する有機溶媒量を多くする必要がある。尚、結晶析出に際してあらかじめ $M/50$ ~ $M/10$ 程度の酢酸ソーダを存在させておくと析出時間を早める効果があることが判明した。

得られた結晶は菱形の板状結晶であり、電気泳動的に単一であり、オスファターゼ、ATPase、NADレダクターゼ、NADHオキシターゼを全く含

(6)

まない。

得られた結晶微生物 LPL の理化学的性質は次の通りである。

結晶微生物 LPL の理化学的性質

至適 pH : 4.0 及び 8.0 (第 1 図に示す通り)

pH 安定性 : 4.0 ~ 11.0 (45℃ 30 分処理) (第 2 図に示す通り)

分子量 : 約 30,000
(ゲル透過及び SDS デイスク電気泳動法による)

紫外部吸収 : $E_{1cm}^{0.1\%} = 0.982, 280 \text{ nm}$
(第 3 図に示す通り)

等電点 : pH 4.3 ± 0.1
(アンホライン等電点電気泳動法による)

分解点 : 238 ~ 279℃

IR : 第 4 図に示す通り

糖含量 : 陰性 (フェノール硫酸法)

結晶形 : 菱形の板状 (第 5 図に示す通り)

次に本発明における微生物 LPL の活性の測定法を示す。

〔活性測定法〕

基質として合成カイロマイクロン〔牛血清アルブミン (和光一級) : ファットゲンと大日本製薬 (7)〕

抽出して得られる微生物 LPL 含有液を合せて得られる酵素液に各種水溶性有機溶媒を各割合加え、攪拌、静置後、生じた夾雑蛋白質等の沈澱を濾過により除去し、濾液の微生物 LPL 活性の回収率 (%) を測定した。その結果を表 1 に示す。

(9)

特開昭53-20487(3)

柱製品) = 4 : 1 の容量割合にて混合活性化したもの) 1 ml, M/10 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 0.5 ml 酵素液 0.5 ml を共栓付試験管に入れ、37℃にて 20 分間反応させ、次に抽出液 n-ヘプタン : イソプロピルアルコール : 2N 硫酸 = 10 : 4 : 1 (容量比) の混合液 5 ml を加え、反応を停止させ、同時に強く振盪して 10 分間以上放置する。さらに n-ヘプタン 3 ml 蒸留水 2 ml を加え強く振盪後放置する。その上層ヘプタン部分を適量採取し、指示薬として 1% チモールブルーアルコール溶液を添加し、M/100 苛性カリ溶液にて窒素ガスを通じながら中和滴定し、苛性カリの使用量から遊離脂肪酸の濃度を求め、1 分間に 1 μ 当量の脂肪酸を遊離する酵素量を 1 単位とする。

次に本発明の実施の態様について試験例及び実施例を示す。

試験例 1.

シュードモナス・フルオレツセンス IAM 1057 を実施例 1 に示す微生物 LPL 生産培地で培養後、除菌濃縮して得た微生物 LPL 含有培養液及び菌体

(8)

処理濃度	有機溶媒の微生物 LPL 活性の回収率 (%)						
	メタノール	エタノール	プロパノール	イソプロパノール	ブタノール	アセトン	メチルセロソルブ
1.0 倍量	105	106	99	99	109	99	98
1.25	106	105	103	99	107	100	93
1.5	110	110	93	90	98	105	85
2.0	108	120	81	70	85	71	84
2.5	115	115	57	50	33	20	84
3.0	111	101	-	-	-	-	-

(10)

上記結果より有機溶媒の種類及び濃度により微生物 LPL 活性の回収率は異なるものの、高濃度有機溶媒処理によつても微生物 LPL は沈澱せず溶液中に留まり、他方夾雑蛋白質等は沈澱除去出来るのである。かくして本処理操作により微生物 LPL の比活性が一気に上昇するのである。

試験例 2.

試験例 1 と同様にして得られた微生物 LPL 含有液に 1.5 倍量のアセトンを添加し生じた沈澱を除去したアセトン処理液 50 ml に各種塩類を加え、攪拌静置後塩析物を含まない上層、下層の両液層区分に残存する微生物 LPL 活性を測定した。その結果を表 2 に示す

表 2.

塩 類	添加量	微生物 LPL 活性(%)	
		上層区分	下層区分
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 g	12	2
K ₃ PO ₄	10 g	12	0
Na ₂ CO ₃	10 g	40	2
CH ₃ COONa	6 g	0	0

(11)

を肉エキス 0.3 g、ポリペプトン 1.5 g、尿素 0.6 g、グルコース 1.0 g、KH₂PO₄ 0.2 g、MgSO₄·7H₂O 0.05 g、KCl 0.05 g、オリーブ油 1.0 g を含有する pH 6.0 の培地に 26℃ で 4 日間ジャーフアメンターにて通気攪拌培養し、その培養液に珪藻土を加えて濾過し、濾液を減圧下で約 1/5 に濃縮して微生物 LPL 含有液 2 g を得る。この濃縮液に冷イソプロパノール 3 g を加え生じる沈澱を除去後、硫酸 750 g を加え塩析操作を行ない静置後上層の溶媒を除去して後、濾過によつて生じた沈澱を集め、イソプロパノールによる洗浄をくり返したのち、真空乾燥する。こうして比活性 2000 の微生物 LPL 500 mg が得られる。

実施例 2.

シュードモナス・エルギノーサ IAM 1095 をコーンステープリカー 1 g、尿素 0.6 g、グルコース 0.5 g、大豆油 1 g を含有する pH 6.0 の培地に 26℃ で 4 日間ジャーフアメンターにて通気攪拌培養し、濾過助剤を加えて濾過を行ない 10 g の除菌液を得る。これを 1 g に濃縮し、アセトン

(13)

上記結果は塩析処理により微生物 LPL が溶液にほとんど残存せず従つて沈澱部に移行していることを示している。

試験例 3.

試験例 1 と同様にして得た微生物 LPL 含有液にイソプロパノールを 1.5 倍量加え、これに各種塩類を各添加量で加え攪拌、静置後、生じた微生物 LPL の沈澱部を濾過により除去した除沈液中の微生物 LPL 活性の残存率(%)を測定した。その結果を表 3 に示す。

表 3

塩 類	添加量 (%)	除沈液中の微生物 LPL 活性の残存率 (%)
(NH ₄) ₂ SO ₄	15	10
CH ₃ COONa	12	35
CH ₃ COOK	30	30
NaCl	15	35
LiSO ₄ ·H ₂ O	20	12

実施例 1.

シュードモナス・フルオレッセンス IAM 1057

(12)

1.5 g を加えて生じた沈澱を除去後、酢酸ソーダ 300 g を加えて塩析処理を行なう。静置後アセトン層を除き、生じた沈澱を集め、このものを精製水 0.3 g に溶解し、あらかじめ M/10 酢酸ソーダ液で緩衝化したセファデックス G-50 (ファルマシア製品・商標名)に通す。次いで微生物 LPL の活性区分 0.3 g を集め、1/30 に濃縮後、冷アセトン 15 ml を加えて結晶を析出せしめる。かくして比活性 5,000 の微生物 LPL の菱形板状結晶 40 mg が得られる。

実施例 3.

実施例 1 と同様にして培養されたシュードモナス・エルギノーサ IAM 1095 の培養液の除菌液及び菌体抽出液より得られる微生物 LPL 含有酵液 12 g を 1 g に濃縮後エタノール 3.0 g を加えて生じた沈澱を除去後、さらにエタノール 9.0 g を加え静置し、生じた沈澱を集め少量の精製水で溶解後セファデックス G-50 に通した後活性区分を集め、凍結乾燥する。こうして比活性 1,500 の微生物 LPL 700 mg が得られる。

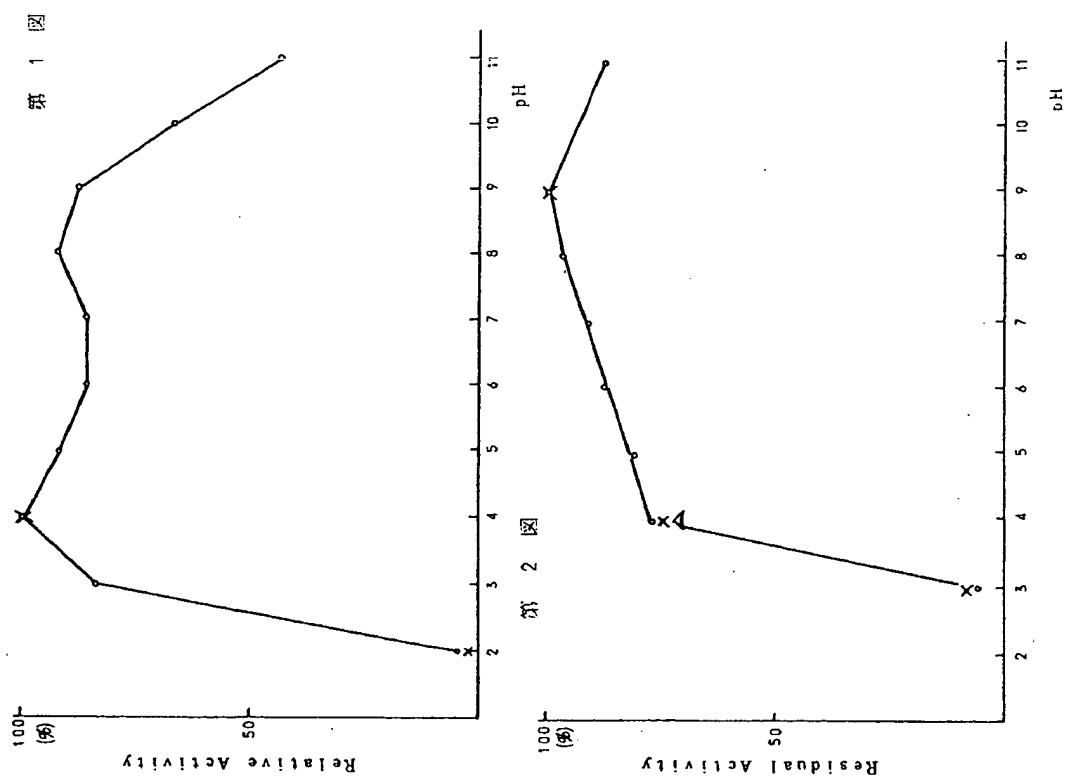
(14)

4. 図面の簡単な説明

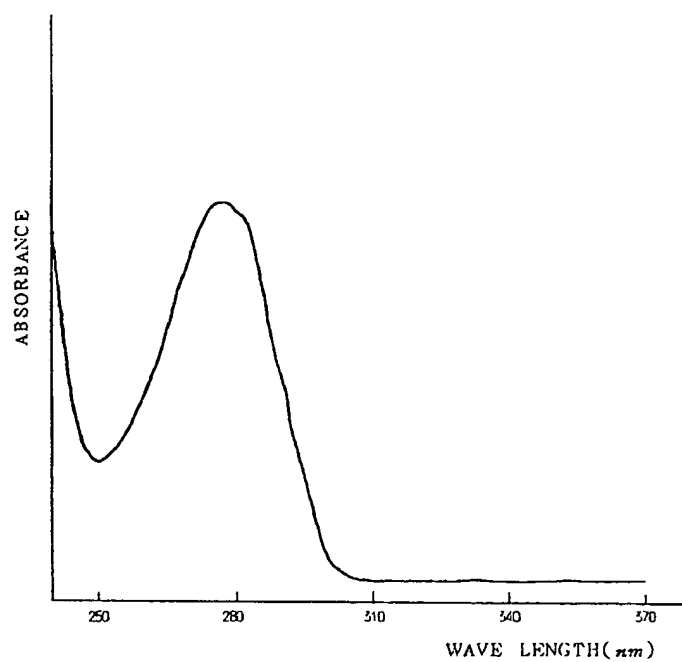
第1図は微生物リポプロテインリパーゼの至適pH曲線、第2図はその安定pH範囲、第3図はその紫外線吸収曲線、第4図はその赤外線吸収曲線、第5図はその結晶写真を示す図である。

代理人 弁理士 戸田 親 男

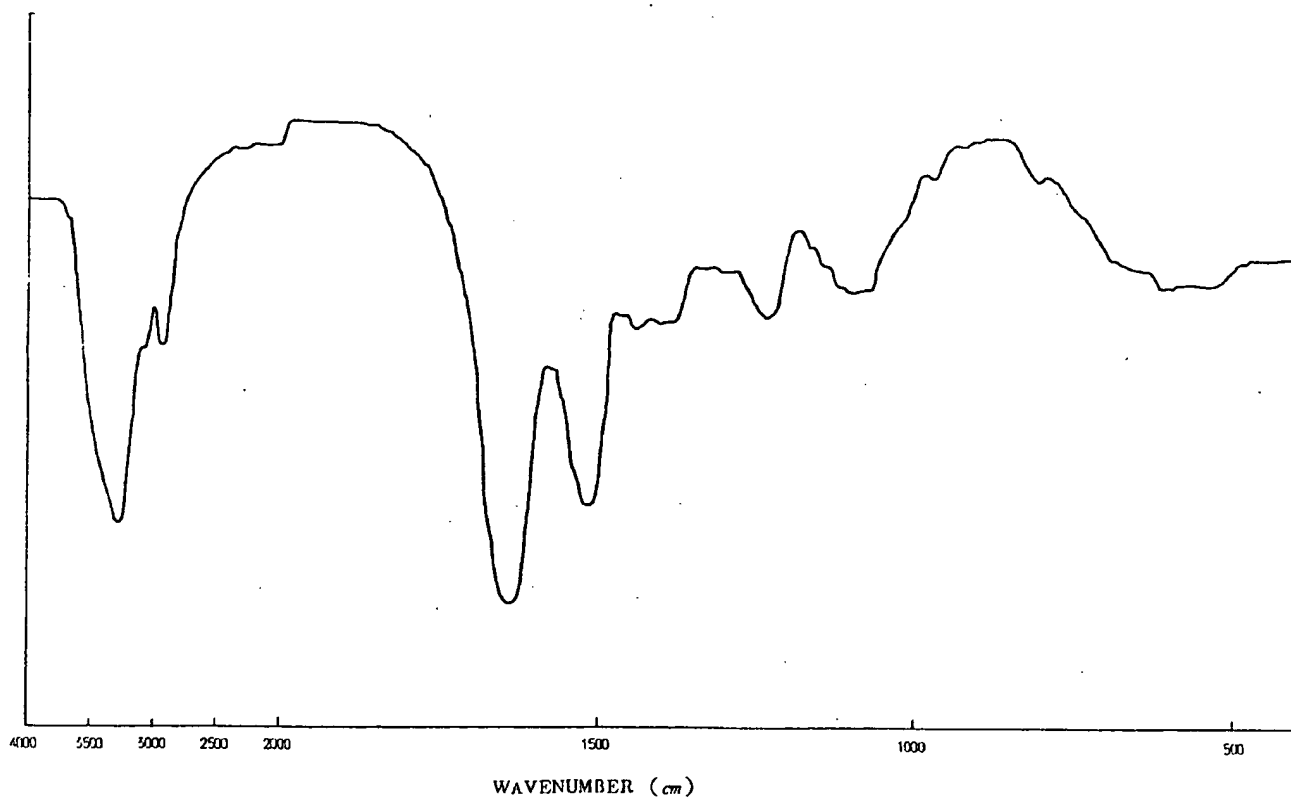
(15)



第 3 図



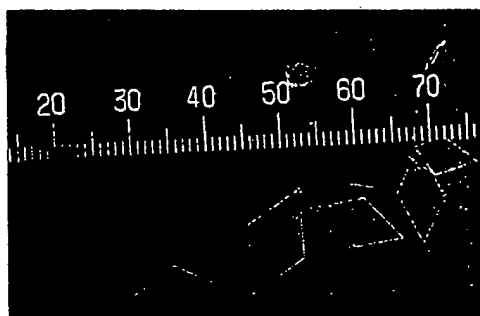
第 4 図



昭和51年11月18日

特許庁長官殿

第 5 図



1. 事件の表示

昭和51年特許願第94957号

2. 発明の名称

微生物リボプロテインリパーゼの精製方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 愛知県名古屋市中区錦1丁目1番2号

アマノセイヤク

名 称 天野製薬株式会社

アマノモトヒロ

代表者 天野 源 博

4. 代 理 人

住 所 〒105 東京都港区芝西久保新川町南第2地

邦楽ビル503

氏 名 弁理士(7577) 戸 田 親 男

電話 591-5627

5. 補正命令の日付

昭和51年10月9日

(昭和51年10月26日発送)

6. 補正の対象 図面の欄及び明細書

7. 補正の内容

- (1) 図面の欄「第5図」の記載を「参考写真」と補正する。
- (2) 明細書7頁17行の「結晶形：菱形の板状（第5図に示す通り）」とあるを「結晶形：菱形の板状（参考写真に示す通り）」と訂正する。
- (3) 明細書15頁4～5行の「、第5図はその結晶写真」を削除する。